

PCT

THE BRITISH LIBRARY
SCIENCE REFERENCE AND INFORMATION SERVICE
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau International



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C12N 9/10, 15/10		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/01540 (43) Date de publication internationale: 15 janvier 1998 (15.01.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01116 (22) Date de dépôt international: 24 juin 1997 (24.06.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/08327 4 juillet 1996 (04.07.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel Voisin, F-92330 Sceaux (FR). CAMERON, Béatrice [FR/FR]; 6, rue Toumefort, F-75005 Paris (FR). (74) Mandataire: SAVINA, Jacques; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165 Antony Cedex (FR).		(81) Etats désignés: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING THERAPEUTIC DNA (54) Titre: PROCEDE DE PRODUCTION D'ADN THERAPEUTIQUE (57) Abstract The invention discloses the preparation of DNA, in particular plasmid DNA. More particularly it concerns the production of bacterial plasmid DNA to be used in gene therapy, in the form of plasmid, minicircle supercoiled, loose or linear. (57) Abrégé La présente invention concerne la préparation d'ADN, notamment plasmidique. Elle concerne plus particulièrement la production d'ADN plasmidique bactérien qui soit utilisable en thérapie génique, sous la forme de plasmide, de minicercle surenroulé, relâché ou linéaire.			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE PRODUCTION D'ADN THERAPEUTIQUE

La présente invention concerne la préparation d'ADN, notamment plasmidique. Elle concerne plus particulièrement la production d'ADN plasmidique bactérien qui soit utilisable en thérapie génique, sous la forme de plasmide, de minicercle surenroulé, relaché ou linéaire, et dont les propriétés immunogènes sont réduites voire supprimées. L'invention concerne également des microorganismes utilisables pour la production d'ADN, ainsi que des compositions pharmaceutiques.

La thérapie génique consiste à corriger une déficience ou une anomalie en introduisant une information génétique dans la cellule ou l'organe affecté. Cette information peut être introduite soit *in vitro* dans une cellule extraite de l'organe et ensuite réinjectée dans l'organisme, soit *in vivo*, directement dans le tissu visé. S'agissant d'une molécule de haut poids moléculaire et de charge négative, l'ADN a des difficultés pour traverser spontanément les membranes cellulaires phospholipidiques. Différents vecteurs sont donc utilisés afin de permettre le transfert de gène : les vecteurs viraux d'une part, les vecteurs chimiques et/ou biochimiques, naturels ou synthétiques, d'autre part. Les vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus, virus adéno-associés,...) sont très efficaces, notamment pour le passage des membranes, mais présentent un certain nombre de risques tels que la pathogénicité, la recombinaison, la réplication, l'immunogénicité, ... Les vecteurs chimiques et/ou biochimiques permettent d'éviter ces risques (pour revues, voir Behr, 1993, Cotten et Wagner, 1993). Ce sont par exemple des cations (phosphate de calcium, DEAE-dextran,...) qui agissent en formant des précipités avec l'ADN, lesquels peuvent être "phagocytés" par les cellules. Il peut également s'agir de liposomes dans lesquels l'ADN est incorporé et qui fusionnent avec la membrane plasmique. Les vecteurs synthétiques de transfert de gènes sont généralement des lipides ou des polymères cationiques qui complexent l'ADN et forment avec lui une particule portant des charges positives en surface. Ces particules sont capables d'interagir avec les charges négatives de la membrane cellulaire, puis de franchir celle-ci. On peut citer comme exemples de tels vecteurs le dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS, TransfectamTM) ou le chlorure de N-[1-

(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA, Lipofectin™). Des protéines chimères ont aussi été développées : elles sont constituées d'une partie polycationique qui condense l'ADN, liée à un ligand qui se fixe sur un récepteur membranaire et entraîne le complexe dans les cellules par endocytose. Il est ainsi
5 théoriquement possible de "cibler" un tissu ou certaines populations cellulaires, afin d'améliorer la biodisponibilité in vivo du gène transféré.

Les plasmides utilisés actuellement en thérapie génique portent généralement (i) une origine de répllication, (ii) un gène marqueur tel qu'un gène de résistance à un antibiotique (kanamycine, ampicilline...) et (iii) un ou plusieurs transgènes avec des
10 séquences nécessaires à leur expression (enhanceur(s), promoteur(s), séquences de polyadénylation...). Ce type de plasmides est par exemple utilisé actuellement en thérapie génique au niveau d'essais cliniques tels que le traitement de mélanomes, Nabel et al., 1992, ou au niveau d'études expérimentales.

L'utilisation d'ADN plasmidique en thérapie génique pose toutefois un
15 certain nombre de problèmes.

En particulier, cela implique la possibilité de produire des quantités importantes d'ADN de pureté pharmacologique. En effet, dans ces techniques de thérapie génique, le médicament est constitué par l'ADN même et il est essentiel de pouvoir fabriquer, dans des quantités adaptées, des ADN ayant des propriétés
20 appropriées à un usage thérapeutique chez l'homme. A cet égard, différentes méthodes de production et/ou purification ont été décrites dans l'art antérieur, permettant d'améliorer la qualité de l'ADN plasmidique (PCT/FR95/01468; FR96 03519).

Par ailleurs, l'utilisation d'ADN porteur de gènes de résistance à des
25 antibiotiques ou d'origines de répllication fonctionnelles peut également présenter certains inconvénients, liés notamment à leur dissémination dans l'organisme. Différentes approches ont également été développées pour limiter ces inconvénients (PCT/FR96/00274, FR95 10825).

Un autre inconvenient des ADN plasmidiques utilises jusqu'a present reside dans leur origine. Il s'agit en effet de molecules produites essentiellement dans des organismes procaryotes (bacteries) ou eucaryotes inferieurs (levures), qui possedent potentiellement des motifs immunogenes chez l'homme. Les propriétés immunologiques de l'ADN sont encore assez peu connues. L'ADN bactérien chez la souris conduit i) à la synthèse d'anticorps reconnaissant l'ADN bactérien double brin et simple brin ayant permis l'immunisation mais ne réagissant pas avec l'ADN double brin mammifère, ii) à la stimulation de la production de macrophages et cytokines (D. Pisetsky "the Immunologic Properties of DNA" J. Immunol. 156 (1996) 1). La macromolécule ADN est ainsi dite immunogène. Par ailleurs, une macromolécule peut aussi conduire à une stimulation du système immunitaire sans être immunogène (par exemple corps étranger conduisant à une réponse immunitaire à médiation cellulaire). Les premières évidences suggérant que l'ADN bactérien conduit à une réponse immunitaire ont été décrites par Pisetsky et coll. (1991 J. Immunol. 147 p1759). Ils ont montré que l'ADN de trois espèces bactériennes peut stimuler la prolifération de lymphocytes de souris alors que l'ADN extrait de trois espèces animales ne conduit pas à cette stimulation. Puis, Yamamoto et coll. (1992 Microbiol. Immunol. 36 p983) ont observé que l'ADN bactérien de six espèces conduit dans les cellules de rate de souris BALB/c à une augmentation de l'activité NK "natural killer" et à l'induction de la production d'interférons. Mais l'ADN extrait de dix espèces vertébrées ne conduit à aucune de ces réponses. En outre, Krieg et coll. ont décrit en 1995 (Nature vol374 p546) qu'un fragment d'ADN génomique de E.coli induit in vitro la prolifération de cellules B murines et la sécrétion d'immunoglobulines IgM, alors que ce même ADN bactérien, traité in vitro avec une CpG méthylase, n'induit pas une telle réponse. Krieg et coll. ont aussi indiqué qu'en présence d'ADN non méthylé, l'interféron γ est produit, et agit comme facteur costimulant de la différenciation des cellules B en modulant la production d'IL-6 par les cellules B (Krieg et coll. 1996 J. Immunol. 156 p558). De plus un oligonucleotide possédant un motif CpG non méthylé et encadré en 5' par 2 purines et en 3' par 2 pyrimidines conduit in vivo à une sécrétion coordonnée des interleukines IL-6 et IL-12, et d'interférons γ par les cellules NK (IFN- γ), les cellules B (IL-6 et IL-12) et les

lymphocytes T CD4⁺(IL-6 et IFN-g) (Krieg et coll. 1996 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 p2879).

L'ADN plasmidique utilisé jusqu'à ce jour en thérapie génique est essentiellement produit dans des cellules procaryotes, et presente donc un profil de
5 methylation comparable a celui de l'ADN genomique bacterien. Il a en outre ete demontre que l'ADN plasmidique qui a été injecté dans le muscle ou dans le foie, puis extrait, conserve le profil de méthylation procaroyte (Wolf et coll. 1992 Hum. Mol. Genet.1 p363; Malone et coll. 1995 J. Biol. Chem. 269 p29903). De ce fait, l'ADN plasmidique bacterien utilisé presente un potentiel de stimulation du système
10 immunitaire important.

Il serait donc particulièrement avantageux de pouvoir disposer d'ADN plasmidique ayant des propriétés immunologiques réduites, voire supprimées. Il serait également particulièrement avantageux de pouvoir disposer d'un procédé permettant de produire, à une Échelle compatible avec une utilisation industrielle,
15 des ADN plasmidiques de ce type.

La présente invention apporte une solution à ces problèmes. La demanderesse s'est en effet intéressée aux propriétés immunogènes de l'ADN bactérien. La demanderesse a maintenant mis au point un procédé permettant de produire des ADN plasmidiques de qualité pharmaceutique, potentiellement dépourvus d'effets
20 immunogènes indésirables. La demanderesse a également montré que la méthylation de certains résidus de d'ADN permettrait de réduire le potentiel immunogène des ADN plasmidiques, sans affecter leur capacité de transfecter des cellules et d'y exprimer un acide nucléique d'intérêt.

Un aspect de l'invention est de préparer des ADN, notamment plasmidiques,
25 de qualité thérapeutique. Selon un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation en thérapie génique d'ADN plasmidique méthylé sur les cytosines des dinucléotides 5'-CG-3'. Un troisième aspect de l'invention est relatif à des compositions pharmaceutiques comprenant des ADN plasmidiques méthyles. L'invention concerne encore un procédé de méthylation in vivo d'ADN par

expression d'une méthylase. L'invention dans d'autres aspects, est relative à des cassettes d'expression, des microorganismes hotes utilisables pour la méthylation, la préparation de compositions thérapeutiques, et des méthodes de transfert de gènes.

5 Un premier objet de l'invention concerne donc un procédé de production d'ADN utilisable en thérapie génique caractérisé en ce que ledit ADN est produit dans une cellule contenant une cassette d'expression d'une ADN méthyltransférase permettant de méthyliser les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3'.

La présente invention concerne donc la production d'ADN, notamment plasmidique, méthylé sur les résidus cytosine des dinucléotides 5'-CG-3'.

10 La méthylation d'ADN plasmidique *in vitro* est documentée dans la littérature (Adams et coll. 1992 FEBS Letters 309 p97 ; Doerfler 1994 FEBS Letters 344 p251 ; Komura et coll. 1995 Biochim. Biophys. Acta 1260 p73). Cependant, ce mode de méthylation n'est pas envisageable pour la production industrielle de plasmide qui serait utilisé en thérapie génique. Un procédé de production d'ADN
15 plasmidique doit en effet permettre de produire de façon reproductible des quantités de plasmides importantes et homogènes et de purifier cet ADN par des méthodes acceptables pour un usage pharmaceutique. Il est bien clair qu'un ADN méthylé *in vitro* peut-être plus ou moins relâché de lot à lot (Doerfler 1994 FEBS Letters 344 p251) et que les quantités produites sont limitées.

20 La présente invention montre maintenant qu'il est possible de méthyliser un plasmide d'intérêt directement au cours de la production, en coexprimant dans la cellule hôte le gène codant pour une méthylase. La présente invention montre également que, selon ce procédé, des quantités importantes et homogènes de plasmide méthylé peuvent être produites et l'ADN plasmidique méthylé peut être
25 purifié selon des procédés déjà décrits. La demanderesse a également démontré, de manière avantageuse, que l'ADN plasmidique ainsi méthylé conserve la capacité de transfecter des cellules cibles et, le cas échéant, de s'y répliquer. De manière particulièrement remarquable, la demanderesse a encore démontré que l'ADN plasmidique ainsi méthylé peut, *in vivo*, exprimer des acides nucléiques d'intérêt.

De nombreuses études renforcent en effet l'idée que l'hyperméthylation est corrélée avec l'inhibition ou l'inactivation des promoteurs et que des promoteurs activement transcrits sont souvent hypo-ou non méthylés. Ainsi, s'agissant de promoteurs viraux, si le promoteur tardif E2A du génome de l'adénovirus de type 2 est entièrement méthylé sur les dinucléotides 5'-CG-3', dans les cellules transformées de hamster HE1, et non méthylé dans les cellules transformées de hamster HE2; le gène E2A est silencieux dans HE1 et transcrit dans HE2 (W. Doerfler 1995 Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 p209). Un autre exemple est décrit par Kohn et coll. (1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 p2567) qui montrent que l'absence d'expression à partir du vecteur rétroviral LTR transduit dans des cellules souches hématopoïétiques est associée à la méthylation *in vivo*. L'inhibition de l'expression d'un gène rapporteur, sous le contrôle d'un promoteur viral, lorsque ce gène est introduit en transfection transitoire par un plasmide méthylé *in vitro* a également été démontrée (Adams et coll. 1992 FEBS Letters 309 p97 ; Doerfler 1994 FEBS Letters 344 p251 ; Komura et coll. 1995 Biochim. Biophys. Acta 1260 p73). Par ailleurs, Razin et coll. (precitée) ont montré que le promoteur du gène codant pour la thymidine kinase de l'herpès simplex de type I et celui du gène codant pour la métallothionéine de souris sont inactifs lors d'expression transitoire dans les cellules de souris L et les cellules murines teratocarcinomes F9 si ces promoteurs sont méthylés sur les dinucléotides 5'-CG-3'.

La présente invention décrit donc pour la première fois un procédé permettant la production d'ADN plasmidique méthyle, homogène et compatible avec une utilisation industrielle, et démontre la possibilité d'utiliser ce type de plasmide pour l'expression de gènes *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*, notamment dans des applications de thérapie génique.

Le procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre dans différents types d'hotes cellulaires. Il s'agit notamment de toute cellule non-humaine, essentiellement dépourvue d'un système de méthylation des cytosines des dinucléotides 5'-CG-3'. L'absence de méthylation peut être le résultat de l'absence d'activité enzymatique appropriée, due soit à une expression insuffisante d'un gène correspondant, soit à

l'absence dudit gène. Il s'agit préférentiellement de cellules procaryotes ou eucaryotes simples.

Avantageusement, l'hôte cellulaire est une bactérie. Parmi les bactéries, on peut citer plus préférentiellement E.coli, B. subtilis, Streptomyces, Pseudomonas (P. putida, P. aeruginosa), Rhizobium meliloti, Agrobacterium tumefaciens, Staphylococcus aureus, Streptomyces pristinaespiralis, Enterococcus faecium ou Clostridium. On peut aussi utiliser des entérobactéries telles que Salmonella typhimurium, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Erwinia carotovora ou Serratia marcescens. Préférentiellement, l'hôte cellulaire utilisé est un organisme non pathogène et permet de produire des quantités d'ADN plasmidique importantes et homogènes. A titre d'exemple particulièrement préféré, on utilise E. coli.

Le procédé de l'invention permet la production d'ADN de qualité thérapeutique.

L'ADN peut être toute molécule d'ADN, simple-brin ou double-brin, linéaire ou circulaire, replicative ou non, intégrative ou non, sous la forme de plasmide, de minicercle surenroulé, relâché ou linéaire. Dans la suite du texte, l'ADN sera également référencé ADN plasmidique ou plasmide TG (pour plasmide utilisable en thérapie génique).

Les plasmides TG généralement utilisés en thérapie génique portent essentiellement (i) une origine de répllication, (ii) un ou plusieurs acides nucléiques d'intérêt (gène thérapeutique) avec des séquences nécessaires à leur expression (enhanceur(s), promoteur(s), séquences de polyadénylation...), et éventuellement (iii) un gène marqueur.

Le choix de l'origine de répllication est principalement déterminé par l'hôte cellulaire utilisé pour la production.. Il peut s'agir d'une origine de répllication issue d'un plasmide du groupe d'incompatibilité P (exemple = pRK290) qui permet la répllication dans les souches d'E. coli pol A. Plus généralement, il peut s'agir de toute origine de répllication issue d'un plasmide se répliquant dans les cellules procaryotes

ou eucaryote inferieures. Ce plasmide peut être un dérivé de pBR322 (Bolivar et al., Gene 2 (1977) 95), un dérivé de pUC (Viera et Messing, Gene 19 (1982) 259), ou d'autres plasmides dérivant du même groupe d'incompatibilité, c'est-à-dire de ColE1 ou de pMB1 par exemple. Ces plasmides peuvent être choisis par ailleurs dans d'autres groupes d'incompatibilité se répliquant chez Escherichia coli. Il peut s'agir de plasmides dérivés de plasmides appartenant aux groupes d'incompatibilité A, B, FI, FII, FIII, FIV, H1, H11, I1, I2, J, K, L, N, OF, P, Q, T, U, W, X, Y, Z ou 9 par exemple. D'autres plasmides peuvent encore être utilisés, parmi lesquels des plasmides ne se répliquant pas chez E. coli mais chez d'autres hôtes tels que B. subtilis, Streptomyces, P. putida, P. aeruginosa, Rhizobium meliloti, Agrobacterium tumefaciens, Staphylococcus aureus, Streptomyces pristinaespiralis, Enterococcus faecium ou Clostridium. A titre préférentiel, on utilise les origines de répllication issues de plasmides se répliquant chez E. coli. Selon une variante particulière, l'origine de replication peut être une origine conditionnelle, c'est-à-dire dont l'activité dépend de la présence de facteurs en trans. L'utilisation de ce type d'origine de replication évite la replication de l'ADN plasmidique après administration, par exemple chez l'homme (FR95 10825).

Parmi les gènes marqueur on peut citer un gène de résistance, notamment à un antibiotique (ampicilline, kamamycine, généticine, hygromycine, etc), ou tout gène conférant à la cellule une fonction qu'elle ne possède plus (par exemple un gène qui a été délété sur le chromosome ou rendu inactif), le gène sur le plasmide rétablissant cette fonction.

Selon un mode de réalisation particulier, l'ADN plasmidique comporte des séquences permettant d'éliminer, après la phase de production, toutes les régions essentiellement non-thérapeutiques (Origine de replication, gène marqueur, etc). Une approche particulièrement avantageuse pour générer ce type de molécule (minicercles) a été décrite dans la demande PCT/FR96/00274.

L'ADN plasmidique selon l'invention est préférentiellement une molécule d'ADN double-brin comportant un ou plusieurs acides nucléiques d'intérêt avec des

séquences nécessaires à leur expression. Selon un mode préféré, il s'agit d'une molécule circulaire, replicative ou integrative. Avantageusement, l'ADN plasmidique contient essentiellement un ou plusieurs acides nucléiques d'intérêt avec des séquences nécessaires à leur expression (miniplasmide).

- 5 L'acide nucléique d'intérêt peut être tout acide nucléique (ADNc, ADNg, ADN synthétique ou semi-synthétique, etc) dont la transcription et éventuellement la traduction dans une cellule génèrent des produits ayant un intérêt thérapeutique, vaccinal, agronomique ou vétérinaire.

- 10 Parmi les acides nucléiques ayant des propriétés thérapeutiques, on peut citer plus particulièrement les gènes codant pour des enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc (FR 93 05125), la
- 15 dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, les gènes suicides : Thymidine kinase, cytosine désaminase, etc; ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou artificielle (Fab, ScFv, etc), un ARN ligand
- 20 (WO91/19813) etc. Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique
- 25 décrite dans le brevet EP 140 308.

L'acide nucléique d'intérêt peut aussi être un gène vaccinant, c'est-à-dire un gène codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire, en vue de la réalisation de vaccins. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus

HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Généralement, dans les plasmides, l'acide nucléique d'intérêt thérapeutique, vaccinal, agronomique ou vétérinaire contient également une région promotrice de la
5 transcription fonctionnelle dans la cellule ou l'organisme cible (i.e. les mammifères, en particulier l'homme), ainsi qu'une région située en 3', et qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation. Concernant la région promotrice, il peut s'agir d'une région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule ou
10 l'organisme concernés. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser tout promoteur ou séquence dérivée
15 stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, inductible ou non, forte ou faible. Il peut s'agir en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK, α -actine, tubuline, etc), de promoteurs des filaments intermédiaires (promoteur des gènes GFAP, desmine, vimentine, neurofilaments, kératine, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par
20 exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, ApoAI, etc), de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate kinase, villine, protéine intestinale de liaison des acides gras, α -actine du muscle lisse, etc) ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc). De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues
25 du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, ou encore le promoteur du LTR du RSV ou du MMTV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

Par ailleurs, le gène d'intérêt peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit synthétisé, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence
5 signal artificielle.

Selon l'acide nucleique d'intérêt, les ADN plasmidiques méthyles de l'invention peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies, incluant les maladies génétiques (dystrophie, fibrose kystique, etc), les maladies neurodégénératives (alzheimer, parkinson, ALS, etc), les cancers, les
10 pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéïnémies, les pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), ou dans les domaines agronomique et vétérinaire, etc. Ils sont particulièrement avantageux pour le traitement des pathologies dans lesquelles une expression durable sans réaction immunologique est souhaitée, notamment dans le domaine des maladies génétiques,
15 neurodégénératives et cardiovasculaires.

Comme indique ci-avant, le procédé selon l'invention utilise une cellule hôte contenant une cassette d'expression d'un ADN méthyltransférase permettant de méthyle les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3'.

Après synthèse de l'ADN, certaines purines et pyrimidines sont modifiées
20 chimiquement, par exemple par méthylation. Ainsi, la 5-méthylcytosine ou la N⁶-méthyladénine entrent dans la composition de certains ADN. Ces modifications ont lieu à l'aide d'ADN méthyltransférases, de maintien ou de novo, qui transfèrent un groupe méthyle de la S-adénosyl-L-méthionine à des résidus adénine ou cytosine qui peuvent être situés à des positions spécifiques dans les séquences. Par exemple, chez
25 *E. coli* deux ADN méthyltransférases sont bien connues, l'ADN méthyltransférase dam, qui méthyle les résidus adénosine au sein des séquences 5'-GATC-3', et l'ADN méthyltransférase dcm, qui méthyle le second résidu cytidine des séquences 5'-CCA/TGG-3'. D'autres ADN méthylases ont été étudiées chez les bactéries, qui méthylent un résidu contenu dans un site de reconnaissance d'une enzyme de

restriction. Par exemple, l'enzyme M. HpaII méthyle le second résidu cytosine dans la séquence 5'-CCGG-3'.

La plupart des eucaryotes simples et des invertébrés contiennent relativement peu de 5-méthylcytosine et de N⁶-méthyladénine. Cependant la méthylation de bases
5 chez les vertébrés est plus importante et dans ce cas la 5-méthylcytosine est la plus fréquente des bases méthylées. En effet plus de 95 pour cent des groupes méthyle de l'ADN des vertébrés se trouve sur les résidus C des rares dinucléotides 5'-CG-3' (la fréquence de 0,8 % de 5'-CG-3' sur les séquences mammifères est très faible bien que le pourcentage en GC soit en moyenne de 40% et qu'un arrangement non biaisé
10 conduirait à une fréquence de 4% de 5'-CG-3'). Et, plus de 50 pour cent de l'ensemble des dinucléotides peuvent être méthylés. Différentes évidences suggèrent que le degré de méthylation de certaines séquences contenant le dinucléotide 5'-CG-3' puisse être un facteur déterminant chez les mammifères dans la régulation de l'expression de gènes particuliers, l'inactivation du chromosome X, l'oncogénèse
15 (1993 in DNA methylation: Molecular Biology and Biological Significance, Eds Jost et Saluz), et encore des maladies héréditaires (Bates et coll. 1994 BioEssays 16 p277).

La présente invention utilise une cassette d'expression d'une ADN méthyltransférase permettant de méthyle les résidus cytosine sur les dinucléotides
20 5'-CG-3'. De ce fait, au sens de la présente invention, ADN méthyle signifie plus particulièrement ADN méthyle sur les résidus cytosine des dinucléotides 5'-CG-3'. Avantagusement, l'ADN méthyltransférase utilisée méthyle préférentiellement les résidus cytosine des dinucléotides 5'-CG-3', c'est-à-dire n'affecte quasiment pas les résidus adénine, ni les résidus cytosine qui sont présents dans un contexte différent
25 des dinucléotides 5'-CG-3'. Avantagusement, on entend par ADN plasmidique méthyle un ADN plasmidique dont au moins 50 % des résidus cytosine des dinucléotides 5'-CG-3' sont méthylés. Plus préférentiellement, au moins 80 %, avantagusement 90 % desdits résidus sont méthylés.

La méthylation de l'ADN plasmidique peut être vérifiée de différentes manières. En particulier, elle peut être contrôlée en digérant les préparations plasmidiques par des enzymes de restriction dont la coupure n'est pas possible si le résidu cytosine du dinucléotide 5'-CG-3', contenu dans le site de coupure, est méthylé. On peut citer par exemple les enzymes de restrictions HpaII, AatII, BstBI. La methylation peut egalement etre determinee par chromatographie. Ainsi, la quantité de plasmide non méthylé présente dans la préparation de plasmide méthylé a été quantifiée de la façon suivante : au plasmide non méthylé non digéré sont ajoutés 1 % ou 5 % de plasmide non méthylé et totalement digéré par HpaII. Ces échantillons, ainsi que le plasmide méthylé digéré par HpaII, sont analysés par chromatographie liquide échangeuse d'anions et détection à 260 nm, ce qui permet de séparer et quantifier l'ADN non digéré de l'ADN digéré. On constate que le plasmide méthylé contient moins de 5 % d'ADN plasmidique non méthylé, autrement dit que plus de 95% de l'ADN plasmidique est méthyle.

Avantageusement, le procédé de l'invention est caractérisé en ce que l'ADN méthyltransférase méthyle préférentiellement les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3'.

Avantageusement, dans le procédé selon l'invention, plus de 50% des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles. Encore plus préférentiellement, plus de 80 %, particulièrement plus de 90 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.

Plusieurs ADN méthyltransférases mammifères permettant de méthyler les résidus cytosine sur les séquences contenant tout dinucléotide 5'-CG-3' ont été caractérisées et les gènes correspondant ont été clonés, par exemple celle de la souris (Bestor et coll. 1988 J. Mol. Biol. 203 p971) ou celle de l'homme (Yen et coll. 1992 Nucl. Acids Res. 20 p2287). Ces enzymes ont un poids moléculaire compris entre 135 et 175 kD. Elles méthylent l'ADN hémiméthylé beaucoup plus rapidement que le non méthylé, suggérant que ce sont des méthylases de maintien (Smith 1994 Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 49 p65). L'enzyme

homologue chez *E. coli* n'existe pas. Par contre la méthylase M. SssI de *Spiroplasma* méthyle exclusivement et complètement les résidus cytosine de tout dinucléotide 5'-CG-3' avec une vitesse comparable, quelque soit le substrat hémiméthylé ou non méthylé (Razin et coll. 1992 FEBS letters 313 p243; Baker et coll. 1993 Biochim. Biophys. Acta 196 p864). Cette enzyme a été isolée à partir de la souche *Spiroplasma* sp. MQ1. Son poids moléculaire est de 42 KD et le gène a été cloné et surexprimé chez *E. coli* (Razin et coll. 1990 Nucl. Acids Res. 18 p1145 et EP0412676A1 derwent 91045812).

Préférentiellement, l'ADN méthyltransférase est choisie parmi la méthylase M.SssI, la méthylase de souris et la méthylase humaine. Avantagusement, on utilise la méthylase M.SssI.

La cassette d'expression de l'ADN méthyltransférase comprend généralement un acide nucléique codant pour une ADN méthyltransférase permettant de méthyliser les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' sous le contrôle d'un promoteur. Le promoteur utilisé à cet effet peut être tout promoteur fonctionnel dans la cellule hôte choisie. À cet égard, il peut s'agir d'un promoteur tel que défini ci-avant. S'agissant d'hôtes cellulaires procaryotes, on peut citer plus particulièrement les promoteurs de l'opéron lactose (Plac), de l'opéron tryptophane (Ptrp), les promoteurs hybrides Plac/Ptryp, le promoteur P_L ou P_R du bactériophage lambda, le promoteur du gène tetA (in Vectors 1988 p179 Rodriguez et Denhardt éditeurs), etc.

Dans un mode de réalisation préféré, on utilise un promoteur différent de celui responsable de l'expression de l'acide nucléique d'intérêt dans l'ADN plasmidique. Il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un promoteur inductible, permettant de contrôler l'expression de la méthylase. Le promoteur inductible peut être par exemple le promoteur du bactériophage T7 ou le promoteur Plac.

Avantagusement, la cassette d'expression contient également des signaux de fin de transcription (terminateurs transcriptionnels), tels que des terminateurs ribosomaux.

La cassette d'expression de l'ADN méthyltransférase peut être portée par un vecteur replicatif, ou être intégrée dans le génome de la cellule hôte.

S'agissant d'un vecteur replicatif, on utilise avantageusement un vecteur compatible avec le plasmide TG, c'est à dire capable de co-resider dans la même cellule. Deux plasmides différents peuvent se répliquer dans la même cellule si le contrôle de la réplication de chaque plasmide est différent. Ainsi des plasmides compatibles appartiennent à deux groupes d'incompatibilité. Or il existe environ 30 groupes d'incompatibilité de plasmides se répliquant chez les entérobactéries (Maas et coll. 1988 Microbiol. Rev. 52 p375). De ce fait, il existe de nombreuses possibilités pour répliquer deux plasmides dans la même cellule et plusieurs exemples sont décrits dans la littérature. On peut citer par exemple la coréplication des plasmides dérivés de ColE1 avec les plasmides ayant pour réplicon R6K ou p15A ou RSF1010 ou RK2 ; on peut encore citer la coréplication des plasmides dérivés de RK2 avec des plasmides dérivés de R6K ou RSF1010 ou pSa ou ColE1 (in Vectors 1988 p287 Rodriguez et Denhardt éditeurs). Cette liste n'est pas limitative et d'autres exemples sont encore décrits dans Vectors 1988 p287 Rodriguez et Denhardt éditeurs. Avantageusement, le vecteur replicatif utilisé présente un nombre de copies différent dans la cellule hôte que le plasmide TG. Ainsi, le vecteur portant le gène codant pour la méthylase, dont l'expression peut être inductible, est à faible nombre de copies (dérivé par exemple de pACYC184 ou RK2), alors que le plasmide TG est à haut nombre de copies (dérivé de ColE1). On peut aussi cloner dans le plasmide TG une séquence permettant de former avec un oligonucléotide approprié une séquence triple hélice de telle sorte que le plasmide TG peut être séparé de l'autre plasmide par une purification d'affinité.

La cassette d'expression de l'ADN méthyltransférase peut également être intégrée dans le génome de la cellule hôte. L'intégration peut être réalisée par recombinaison homologue, dans la mesure où la cassette d'expression est encadrée par des fragments adjacents d'un gène, non essentiel, du génome de l'hôte et clonée sur un plasmide ne pouvant se répliquer dans l'hôte considéré. Ce plasmide peut être

i) un dérivé de ColE1 dans une souche de *E. coli* *polA^{ts}* (Guttererson et coll. 1983

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 p4894); ii) un dérivé thermosensible de pSC101 dans une souche quelconque de *E. coli* (S. Kushner et coll. 1989 J. Bacteriol. 171 p4617) ; iii) un vecteur suicide tel que M13mp10 dans les souches de *E. coli* *sup*⁺ (Blum et coll. 1989 J. Bacteriol. 171 p538) ou encore iv) un plasmide ne comportant que l'origine *g* de R6K dans toute souche de *E. coli* dépourvue du gène *pir* (Filutowicz et coll. 1994 Prog. in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. 48 p239).

La cassette d'expression peut être introduite dans la cellule hôte avant, après ou en même temps que l'ADN plasmidique. S'agissant d'une cassette intégrative, elle est généralement introduite avant, et les cellules contenant ladite cassette sont sélectionnées et utilisées pour la production de l'ADN plasmidique.

Un aspect particulier de l'invention est d'exprimer le gène codant pour la méthylase *M. SssI* dans des cellules bactériennes (notamment *E. coli*) contenant un plasmide TG. Comme indiqué dans les exemples, ledit plasmide est alors méthylé sur les cytosines des dinucléotides 5'-CG-3'. Plus spécifiquement, le plasmide TG est transformé dans une souche de *E. coli* *mcrA mcrB D(mcrC-mrr)* contenant déjà un plasmide portant le gène codant pour la méthylase *M. SssI* et compatible avec le plasmide TG. Au cours de la croissance de la bactérie les deux plasmides corésidant se répliquent et sont méthylés (Gotschlich et al. 1991 J. Bacteriol. 173 p5793).

L'ADN plasmidique ou la cassette d'expression peuvent être introduits dans la cellule hôte par toute technique connue de l'homme du métier (transformation, transfection, conjugaison, électroporation, pulsing, précipitation, etc). La transformation peut notamment être effectuée par la technique de transformation au CaCl₂ (Dagert et Ehrlich, Gene 6 (1979) 23), ou celle mise au point par Hanahan et al. (J.Mol.Biol. 166 (1983) 557) ou toute technique dérivée de celle-ci (Maniatis et al., 1989), ainsi que par électrotransformation (Wirth et al., Mol.Gen.Genet. 216 (1989) 175) ou par TSB (Transformation and Storage Buffer; Chung et coll. 1988 Nucleic Acids Res. 16 p3580). Voir également les techniques générales de Biologie Moléculaire ci-après.

L'ADN plasmidique méthyle selon l'invention peut ensuite être purifié par toute technique connue de l'homme du métier (précipitations, chromatographies, centrifugations, dialyse, etc). Dans le cas particulier de l'utilisation d'un vecteur d'expression de la méthyltransferase replicatif, le plasmide TG doit en outre être
5 séparé dudit vecteur. Différentes techniques peuvent être utilisées, basées sur les différences de taille ou de masse des deux plasmides, ou sur la digestion du vecteur au niveau de sites de restriction présents uniquement dans le vecteur et pas dans le plasmide TG. Une méthode de purification particulièrement avantageuse repose sur la l'affinité entre une séquence spécifique présente sur le plasmide TG et un
10 oligonucleotide immobilisé. Cette purification triple-hélice a été décrite en détail dans les demandes FR96 03519 et FR94 15162, qui sont incorporées à la présente par référence.

Un résultat particulièrement avantageux de l'invention est que l'ADN plasmidique méthylé dans les conditions de l'invention conduit à l'expression du
15 gène sous le contrôle du promoteur aussi bonne que celle obtenue avec le même ADN plasmidique non méthylé. Cet ADN plasmidique méthylé ne devrait pas entraîner la stimulation immunitaire associée aux ADN bactériens et possède donc un avantage certain pour être utilisé en thérapie génique non virale.

Les ADN plasmidiques méthylés selon l'invention peuvent être utilisés dans
20 toute application de vaccination ou de thérapie génique et cellulaire, pour le transfert d'un gène à un organisme, un tissu ou une cellule donnée. En particulier, elles peuvent être utilisées pour une administration directe *in vivo*, ou pour la modification de cellules *in vitro* ou *ex vivo*, en vue de leur implantation à un patient. A cet égard, les molécules selon l'invention peuvent être utilisées telles quelles (sous
25 forme d'ADN nu), ou en association avec différents vecteurs chimiques et/ou biochimiques, synthétiques ou naturels. Il peut s'agir notamment de cations (phosphate de calcium, DEAE-dextran,...) qui agissent en formant des précipités avec l'ADN, lesquels peuvent être "phagocytés" par les cellules. Il peut également s'agir de liposomes dans lesquels la molécule d'ADN est incorporée et qui fusionnent
30 avec la membrane plasmique. Les vecteurs synthétiques de transfert de gènes sont

généralement des lipides ou polymères cationiques qui complexent l'ADN et forment avec lui une particule portant des charges positives en surface. Ces particules sont capables d'interagir avec les charges négatives de la membrane cellulaire, puis de franchir celle-ci. On peut citer comme exemples de tels vecteurs le DOGS (TransfectamTM) ou le DOTMA (LipofectinTM). Des protéines chimères ont aussi été développées : elles sont constituées d'une partie polycationique qui condense l'ADN, liée à un ligand qui se fixe sur un récepteur membranaire et entraîne le complexe dans les cellules par endocytose. Les molécules d'ADN selon l'invention peuvent également être utilisées pour le transfert de gènes dans des cellules par des techniques physiques de transfection telles que le bombardement, l'électroporation, etc. En outre, préalablement à leur utilisation thérapeutique, les molécules de l'invention peuvent éventuellement être linéarisées par exemple par coupure enzymatique.

A cet égard, un autre objet de la présente invention concerne toute composition pharmaceutique comprenant un ADN plasmidique méthylé tel que défini ci-avant. Cet ADN peut être nu ou associé à un vecteur chimique et/ou biochimique de transfection. Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, la molécule d'ADN est utilisée sous une forme injectable ou en application. Elle peut être mélangée à tout véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau du site à traiter. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Il peut s'agir notamment de tampons Tris ou PBS dilués dans du glucose ou du chlorure de sodium. Une injection directe de l'acide nucléique dans la région atteinte du patient est intéressante car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. Les doses d'acide nucléique utilisées peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et

notamment en fonction du gène, du vecteur, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5 **LEGENDE DES FIGURES**

Figure 1. Carte du plasmide pXL2784

Figure 2. Carte de restriction du plasmide pXL2784

Figure 3. Profil de digestion des plasmides 1-pXL2784, 2-pXL2784 méthylé, 3-pXL2784+pAIT2 méthylé et 4-pAIT2-méthylé, digérés par les enzymes A-AatII, 10 B-BstBI, C-HindIII, D-HpaII, E-EcoRI (M est le marqueur de poids moléculaire 1KB ladder).

TECHNIQUES GENERALES DE CLONAGE ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Les méthodes classiques de biologie moléculaire telles que la centrifugation 15 d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium-bromure d'éthidium, les digestions par des enzymes de restriction, l'électrophorèse sur gel, l'électroélution des fragments d'ADN à partir de gels d'agarose, la transformation dans *E. coli*, la précipitation des acides nucléiques etc, sont décrites dans la littérature (Maniatis *et al.*, 1989, Ausubel *et al.*, 1987). Les séquences nucléotidiques ont été déterminées 20 par la méthode de terminaison de chaînes en suivant le protocole déjà présenté (Ausubel *et al.*, 1987).

Les enzymes de restriction ont été fournies par New-England Biolabs (Biolabs), Bethesda Research Laboratories (BRL) ou Amersham Ltd (Amersham).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille sur des 25 gels d'agarose à 0,7 % ou d'acrylamide à 8 %, purifiés par électrophorèse puis électroélution, extraits au phénol, précipités à l'éthanol puis incubés dans un tampon

Tris-HCl pH 7.4 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 2 mM, en présence d'ADN ligase du phage T4 (Biolabs). Les oligonucléotides sont synthétisés en utilisant la chimie des phosphoramidites protégés en b par un groupement cyanoéthyl (Sinha *et al.*, 1984, Giles 1985) avec le synthétiseur automatique d'ADN
5 Applied Biosystems 394 DNA/RNA Synthesizer en utilisant les recommandations du fabricant.

Les milieux de culture LB et 2XTY sont utilisés pour la partie bactériologique (Maniatis *et al.*, 1989).

Les ADN plasmidiques sont purifiés également suivant la technique de lyse
10 alcaline (Maniatis *et al.*, 1989).

EXEMPLES

Exemple 1. Description du plasmide TG

De nombreuses cassettes d'expression eucaryote portées par des plasmides réplicatifs chez la bactérie *E. coli* sont connues de l'homme de l'art. Ces cassettes
15 peuvent exprimer des gènes rapporteurs comme le gène codant pour la b-galactosidase de *E. coli*, ou la chloramphénicol acétyltransférase du transposon Tn9, ou la luciférase, ou des gènes d'intérêt en thérapie génique. Ces cassettes comportent un promoteur qui peut être viral ou eucaryote. ces systèmes d'expression peuvent être tissu spécifique et/ou inductible ou bien avoir une ubiquité d'expression. La cassette
20 utilisée dans cet exemple comprend le gène *luc*, codant pour la luciférase de *Photinus pyralis* et le promoteur pCMV, promoteur/enhanceur intermédiaire du cytomégalovirus humain. Le gène *luc* possède 4,78% de dinucléotides 5'-CG-3', et le promoteur viral pCMV 5 %. Ces pourcentages sont donc élevés par rapport à la fréquence faible de 0,8 % de 5'-CG-3' sur les séquences mammifères. En présence
25 d'une méthylase (telle que le méthylase M. *SssI* ou les CpG méthylases endogènes aux mammifères), le promoteur pCMV et le gène *luc* peuvent être donc hautement méthylés.

Cette cassette d'expression a été clonée dans le plasmide réplcatif chez *E. coli* pXL2784 dont la carte est présentée sur la figure 1. Le plasmide a une taille de 6390 bp et comporte 5,8 % de dinucléotides 5'-CG-3'. Le plasmide pXL2784 a été construit à partir du vecteur pXL2675 (2,513 kb), réplicon minimal de ColE1 issu de pBluescript (ORI) et ayant pour marqueur de sélection le gène du transposon Tn5 codant pour la résistance à la kanamycine. Le plasmide pXL2784 contient aussi une séquence TH (GAA)₁₇ pouvant se lier à un oligomère (CTT)_n où n=1 à 17, pour générer localement une structure triple hélice et permettre une purification par affinité. Le plasmide pXL2784 possède le locus cer (382 bp) issu de ColE1 ; le locus cer contient une séquence site spécifique des recombinases XerC/XerD et conduit à la résolution de dimères de plasmides (Summers et coll. 1988 EMBO J. 7 p851). Le transgène cloné sur ce plasmide pXL2784 est une cassette d'expression (3,3 kb) du gène luc codant pour la luciférase de *Photinus pyralis* (provenant de pGL2 basic de Promega) sous contrôle du enhanceur/promoteur pCMV cytomégalo virus humain (provenant de pcDNA3 d'Invitrogen).

Exemple 2 : Construction d'une cassette d'expression d'une ADN méthyltransferase

Cet exemple décrit la structure d'une cassette d'expression de la méthylase M. SssI de *Spiroplasma* sp. MQ1. Il est entendu que le même principe peut être appliqué à la construction de cassette d'expression de toute autre enzyme selon l'invention.

La cassette d'expression utilisée comprend le gène codant la méthylase M. SssI de *Spiroplasma* sp. MQ1 qui est exprimé sous le contrôle du promoteur plac. Ainsi, en présence IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) la méthylase est synthétisée et active (Gotschlich et al. 1991 J. Bacteriol. 173 p5793).

Cette cassette est présente dans le plasmide pAIT2, qui a pour réplicon le pACYC184 et porte en outre le gène du transposon Tn903 codant pour la résistance à la lividomycine, permettant la sélection des cellules hôtes transformées.

Exemple 3. Production d'ADN plasmidique pXL2784 méthylé aux résidus cytosine des dinucléotides 5'-CG-3'.

Le plasmide pXL2784 est méthylé sur les cytosines de tous les dinucléotides 5'-CG-3' avec la méthylase M. SssI de *Spiroplasma* sp. MQ1. Le mode de
5 méthylation selon l'invention utilise cette enzyme et le plasmide est méthylé au cours de la production chez la bactérie.

Pour cela, la souche de *E. coli* ER 1821 dont le génotype est F^- endA1 thi-1 supE44 mcrA5 D(mcr-hsdRMS-mcrB)1::IS10, et portant le plasmide pAIT2, est transformée par la méthode TSB (Transformation and Storage Buffer; Chung et coll.
10 1988 Nucleic Acids Res. 16 p3580) par le plasmide pXL2784. Les transformants sont sélectionnés sur milieu LB contenant de la kanamycine 50 mg/l et de la lividomycine 100mg/l afin de sélectionner le pXL2784 qui porte le gène du transposon Tn5 codant pour la résistance à la kanamycine et le pAIT2 porte le gène du transposon Tn903 codant pour la résistance à la lividomycine. Lorsqu'un
15 transformant ER1821, pAIT2, pXL2784 est cultivé en milieu LB kanamycine 50mg/l + lividomycine 100 mg/l + IPTG 2,5 mM à 37 °C pendant 15 heures, l'ADN plasmidique extrait est méthylé.

La méthylation est vérifiée en digérant les préparations plasmidiques par les enzymes de restrictions HpaII, AatII, BstBI. L'intégrité et la présence des deux
20 plasmides sont vérifiées en digérant ces préparations par les enzymes de restrictions HindIII et EcoRI, voir figure 2. Les enzymes de restrictions HpaII, AatII, BstBI sont trois enzymes dont la coupure n'est pas possible si le résidu cytosine du dinucléotide 5'-CG-3', contenu dans le site de coupure, est méthylé. Sur le promoteur pCMV sont localisés quatre sites de reconnaissance de AatII ; sur le gène luc sont cartographiés
25 deux sites de reconnaissance de BstBI et onze sites de reconnaissance de HpaII ; ce dernier enzyme coupant le plasmide pXL2784 en 30 fragments. Sur la photographie du gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (figure 2), on constate qu'avec la préparation plasmidique pAIT2+pXL2784 méthylée ou avec la préparation plasmidique pXL2784 méthylée et purifiée par chromatographie d'affinité (voir

exemple 4) aucune digestion n'a lieu avec les enzymes HpaII, AatII, BstBI alors que les digestions par les enzymes HindIII et EcoRI conduisent bien au profil attendu d'après la carte de restriction. Les digestions contrôles par les enzymes HpaII, AatII, BstBI du plasmide pXL2784 présentent le profil escompté d'après la carte de restriction.

Ces résultats montrent que l'ADN plasmidique extrait est méthylé, sur les résidus cytosine du dinucléotide 5'-CG-3'. Ces résultats montrent en outre que la méthylation concerne plus de 90% de ces cytosines.

Exemple 4. Utilisation de plasmides méthyles pour le transfert de matériel génétique

Cet exemple démontre que l'ADN plasmidique méthyle selon l'invention conserve sa capacité de transfecter des cellules, de s'y répliquer, et d'y exprimer un gène d'intérêt.

A protocole de préparation des solutions utilisées pour la transfection

Deux lots de plasmides sont utilisés pour des études comparatives :

- a) le pXL2784,
- b) le pXL2784 méthylé.

Le plasmide pXL2784 méthylé est obtenu sous forme d'un mélange avec le plasmide pAIT2 qui en a assuré la méthylation après co-transformation bactérienne. Un fractionnement par chromatographie d'affinité a été réalisé pour purifier le plasmide d'intérêt et la technique utilisée est décrite dans la demande N° FR 94115162. Une étape de dialyse contre du NaCl 0,15M peut être réalisée pour éliminer le tampon qui constitue la phase d'élution de la colonne.

Lorsque le plasmide pXL2784 est utilisé en référence il est purifié selon le même protocole que celui décrit ci-dessus.

Dans cet exemple la vectorisation de l'ADN est assurée par un lipide cationique, RPR120535A, appartenant à une série décrite dans la demande de brevet N° FR 95 13490. Il est entendu que tout autre vecteur de transfert chimique ou biochimique peut être utilisé.

- 5 Les solutions de transfection sont préparées à partir d'un mélange volume à volume d'ADN à 30 µg/ml et de solution aqueuse de lipide cationique RPR 120535 à 90 µM ; le ratio lipide cationique/ADN est donc de 3 nanomoles lipide cationique/µg ADN. Après homogénéisation au vortex et incubation d'au moins 15 minutes à température ambiante les solutions ADN/lipofectant sont distribuées à 4,8% (V/V)
- 10 final dans les puits où les cellules ont été lavées par du milieu dépourvu de protéines (sérum) et remises en croissance pendant le temps de la transfection en milieu dépourvu de sérum.

B protocole de transfection

- Des échantillons de 1.10^5 cellules [NIH3T3 (fibroblastes de souris) et Hela
- 15 (carcinome utérin humain)] en phase exponentielle de croissance sur 2 cm² (500 µl de milieu sans sérum/puits) sont traités par 25 µl de solution de transfection ce qui correspond à l'apport de 0,375 µg d'ADN/ 1.10^5 cellules. Après une incubation de 24 heures à 37°C sous 5 % de CO₂ en atmosphère humide le milieu de croissance est supplémenté par du sérum de veau foetal à 8 % final (V/V).

- 20 A 40 heures post-transfection les cellules sont lavées par du PBS et lysées par un tampon contenant du Triton X-100 à 1 % et du DTT 2mM. L'activité luciférase exprimée est dosée par l'émission de lumière [RLU = relative light unit] en présence de luciférine, coenzyme A et ATP pendant 10 secondes et rapportée au mg de protéines extraites par le tampon de lyse.

C résultats

Les résultats obtenus selon les conditions décrites ci-dessus figurent dans le tableau suivant.

Cellule	Cellules NIH 3T3		Cellules Hela	
Plasmide	pXL2784	pXL2784CH3	pXL2784	pXL2784CH3
purifié par chromatographie d'affinité	$2,0.10^{10} \pm 4\%$	$2,2.10^{10} \pm 10\%$	$3,1.10^8 \pm 15\%$	$1,7.10^8 \pm 11\%$
et dialysé	$2,3.10^{10} \pm 21\%$	$3,1.10^{10} \pm 10\%$	$3,8.10^8 \pm 14\%$	$2,4.10^8 \pm 7\%$

Activité enzymatique en RLU/10 secondes/mg protéine (coefficient de variation % [3 expériences de transfection par résultat])

Compte tenu des coefficients de variation obtenus pour ce type d'expériences nous pouvons conclure qu'il n'existe pas de différences significatives quant à l'expression des deux plasmides utilisés dans les mêmes conditions de transfection. De plus l'activité luciférase obtenue est du même ordre de grandeur pour les deux étapes de purification considérées.

REVENDICATIONS

1. Procédé de production d'ADN utilisable en thérapie génique caractérisé en ce que ledit ADN est produit dans une cellule contenant une cassette d'expression d'une ADN méthyltransférase permettant de méthyler les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3'.
5
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la cellule est une cellule procaryote.
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que la cellule est une bactérie.
- 10 4. Procédé selon les revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la cassette d'expression est portée par un vecteur replicatif.
5. Procédé selon les revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la cassette d'expression est intégrée dans le génome de la cellule.
- 15 6. Procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la cassette d'expression comprend un acide nucléique codant pour une ADN méthyltransférase permettant de méthyler les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' sous le contrôle d'un promoteur.
7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur inductible.
- 20 8. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'ADN méthyltransférase méthyle préférentiellement les résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3'.
9. Procédé selon la revendication 8 caractérisé en ce que l'ADN méthyltransférase est choisie parmi la méthylase M.SssI, la méthylase de souris et la
25 méthylase humaine.

10. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que plus de 50 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.
11. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que plus de 80 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.
- 5 12. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que plus de 90 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.
13. Utilisation d'un ADN plasmidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement thérapeutique ou diagnostic du corps humain ou animal, caractérisée en ce que plus de 50 % des résidus cytosine des dinucléotide
- 10 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.
14. Utilisation d'un ADN plasmidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement thérapeutique ou diagnostic du corps humain ou animal, caractérisée en ce que plus de 80 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.
- 15 15. Utilisation d'un ADN plasmidique pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement thérapeutique ou diagnostic du corps humain ou animal, caractérisée en ce que plus de 90 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' de l'ADN plasmidique sont méthyles.
16. Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique destinée au
- 20 traitement thérapeutique ou diagnostic du corps humain ou animal comprenant les étapes suivantes :
- la production d'ADN par culture d'une cellule comprenant ledit ADN et une cassette d'expression d'une ADN méthyltransférase permettant de méthyler les résidus cytosine des dinucléotides 5'-CG-3',
 - 25 - la récupération dudit ADN, et,
 - le conditionnement dudit ADN avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

17. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que l'ADN est un ADN plasmidique comprenant un acide nucléique d'intérêt thérapeutique.

18. Procédé selon la revendication 16 caractérisé en ce que l'ADN est un minicercle comprenant un acide nucléique d'intérêt thérapeutique.

5 19. Composition comprenant un ADN bactérien dont au moins 50 % des résidus cytosine des dinucléotide 5'-CG-3' sont méthyles.

1/3

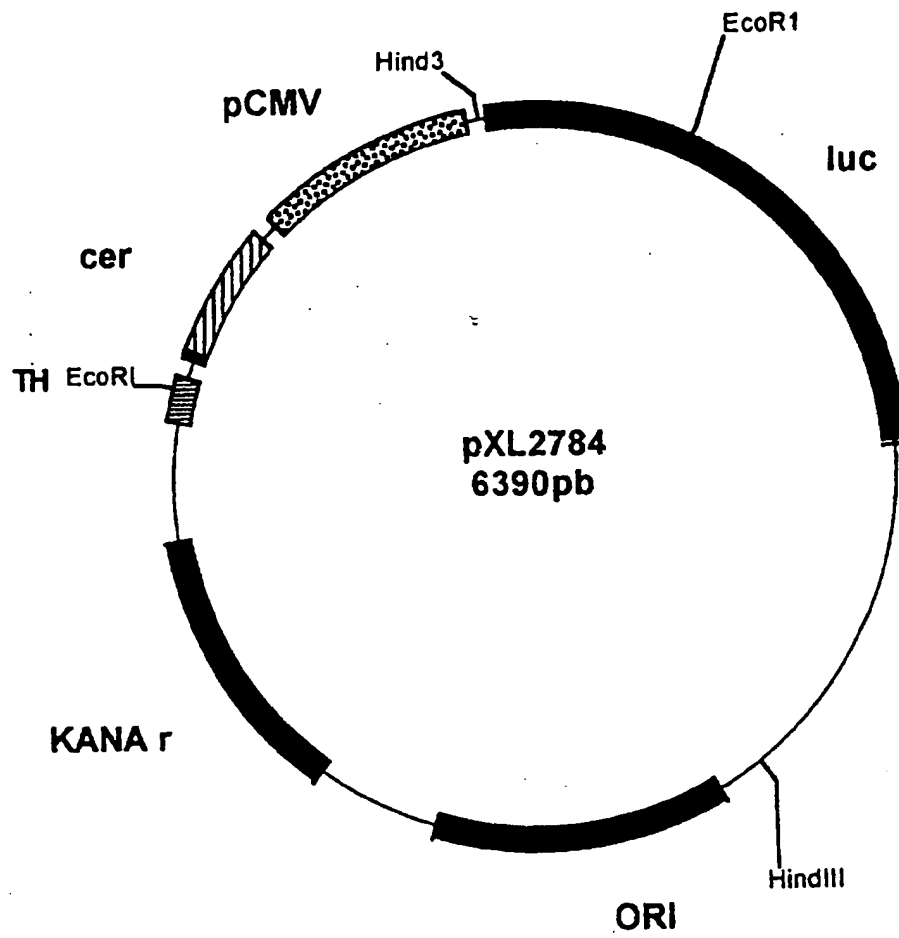


FIGURE 1

2/3

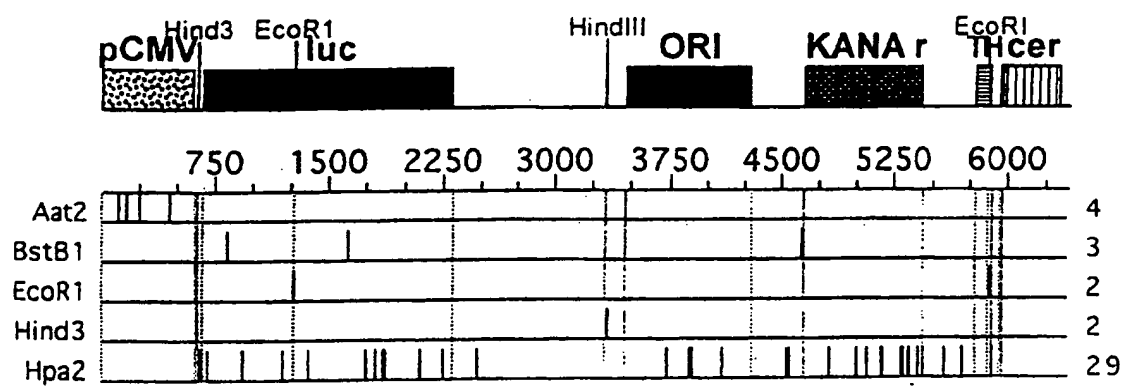


FIGURE 2

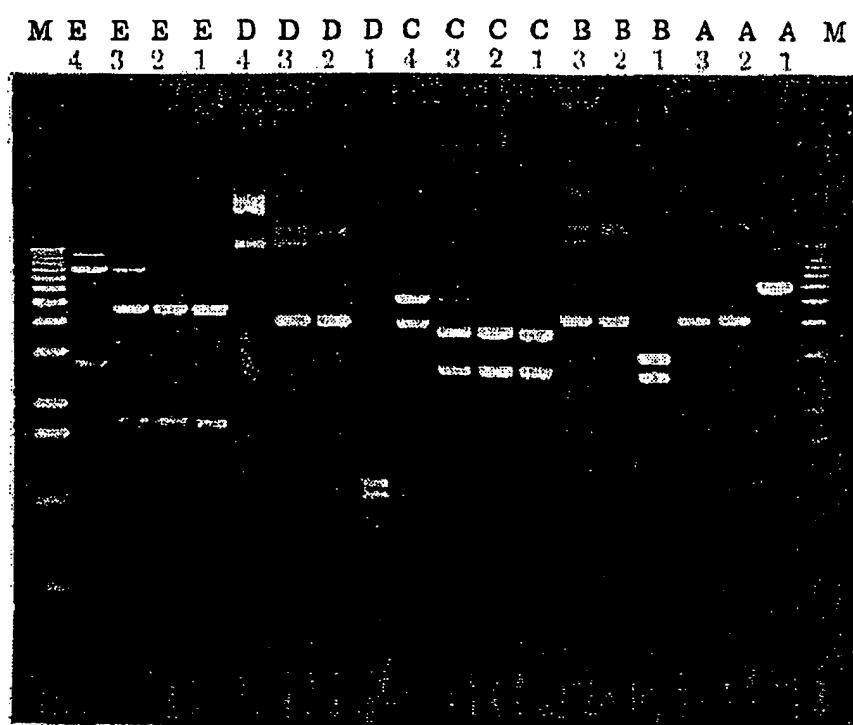


Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/FR 97/01116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N9/10 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NATURE, vol. 374, no. 6522, 1995, LONDON, GB, pages 546-549, XP000197060 A.M. KRIEG ET AL.: "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation" cited in the application (voir dernier paragraphe) see the whole document ---	1-12
Y	WO 96 02555 A (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 1 February 1996 see page 8, line 7-16 see page 19, line 22-35 see page 23, line 4-13 see claims 22,23 ---	1-12
A	---	13-15
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 1997

Date of mailing of the international search report

19.09.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 97/01116

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ANTISENSE RESEARCH AND DEVELOPMENT, vol. 5, no. 3, 1995, NEW YORK, US, pages 219-225, XP002027069 D.S. PISETSKY: "Immunological consequences of nucleic-acid therapy" see the whole document ---</p>	1-19
A	<p>EP 0 412 676 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSA) 13 February 1991 cited in the application see the whole document ---</p>	1-12
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 93, 1996, WASHINGTON, US, pages 2879-2883, XP000197059 D.M. KLINMAN ET AL.,: "CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma" cited in the application see the whole document ---</p>	1-12
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 147, no. 6, 1991, BETHESDA, US, pages 1759-1764, XP000645281 J.P. MESSINA ET AL.,: "Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA" cited in the application see the whole document ---</p>	1-12
A	<p>US 5 470 740 A (M.C. LONGO ET AL) 28 November 1995 see column 2, line 38-50 ---</p>	1-12
A	<p>WO 95 16045 A (BIOTECHNOLOGY AND RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION) 15 June 1995 see page 6, line 11-30 ---</p>	1-19
A	<p>ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 772, 1995, NEW YORK, US, pages 152-163, XP000197067 D.S. PISETSKY ET AL.: "Immunological properties of bacterial DNA" cited in the application see the whole document -----</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No
PCT/FR 97/01116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9602555 A	01-02-96	AU 1912795 A EP 0772619 A	16-02-96 14-05-97
EP 0412676 A	13-02-91	DE 69019890 D DE 69019890 T JP 2538806 B JP 3210176 A US 5296371 A	13-07-95 08-02-96 02-10-96 13-09-91 22-03-94
US 5470740 A	28-11-95	NONE	
WO 9516045 A	15-06-95	US 5587305 A AU 1303195 A EP 0733114 A	24-12-96 27-06-95 25-09-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 97/01116

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N9/10 C12N15/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NATURE, vol. 374, no. 6522, 1995, LONDON, GB, pages 546-549, XP000197060 A.M. KRIEG ET AL.: "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation" cité dans la demande (voir dernier paragraphe) voir le document en entier ---	1-12
Y	WD 96 02555 A (UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION) 1 Février 1996 voir page 8, ligne 7-16 voir page 19, ligne 22-35 voir page 23, ligne 4-13 voir revendications 22,23 ---	1-12
A	---	13-15

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités

- * "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- * "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- * "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- * "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- * "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

* "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

* "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

* "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

* "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 Septembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19.09.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 97/01116

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>ANTISENSE RESEARCH AND DEVELOPMENT, vol. 5, no. 3, 1995, NEW YORK, US, pages 219-225, XP002027069 D.S. PISETSKY: "Immunological consequences of nucleic-acid therapy" voir le document en entier ---</p>	1-19
A	<p>EP 0 412 676 A (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSA) 13 février 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1-12
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 93, 1996, WASHINGTON, US, pages 2879-2883, XP000197059 D.M. KLINMAN ET AL.: "CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma" cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1-12
A	<p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 147, no. 6, 1991, BETHESDA, US, pages 1759-1764, XP000645281 J.P. MESSINA ET AL.: "Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA" cité dans la demande voir le document en entier ---</p>	1-12
A	<p>US 5 470 740 A (M.C. LONGO ET AL) 28 Novembre 1995 voir colonne 2, ligne 38-50 ---</p>	1-12
	<p>WO 95 16045 A (BIOTECHNOLOGY AND RESEARCH AND DEVELOPMENT CORPORATION) 15 Juin 1995 voir page 6, ligne 11-30 ---</p>	1-19
	<p>ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 772, 1995, NEW YORK, US, pages 152-163, XP000197067 D.S. PISETSKY ET AL.: "Immunological proprietes of bacterial DNA" cité dans la demande voir le document en entier -----</p>	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Deman. Internationale No

PCT/FR 97/01116

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9602555 A	01-02-96	AU 1912795 A EP 0772619 A	16-02-96 14-05-97
EP 0412676 A	13-02-91	DE 69019890 D DE 69019890 T JP 2538806 B JP 3210176 A US 5296371 A	13-07-95 08-02-96 02-10-96 13-09-91 22-03-94
US 5470740 A	28-11-95	AUCUN	
WO 9516045 A	15-06-95	US 5587305 A AU 1303195 A EP 0733114 A	24-12-96 27-06-95 25-09-96

THIS PAGE BLANK (USPTO)